

「植物の機能と制御」

平成13年度採択研究代表者

西澤 直子

(東京大学大学院農学生命科学研究科 教授)

「植物の鉄栄養制御」

1. 研究実施の概要

地球上の陸域には67%の不良土壌(石灰質アルカリ土壌, 高塩類集積アルカリ土壌, 強酸性土壌, 重金属集積土壌)が存在する。爆発的に増加すると予想される需要に見合う食糧増産の達成は, これらの不良土壌でも生育する「不良土壌耐性」穀物を遺伝子工学によって積極的に創製することにかかっている。石灰質アルカリ土壌では鉄が水酸化第2鉄の結晶として不溶態化しており, 植物は必須元素である鉄を吸収できずに鉄欠乏に陥る。我々はすでにムギネ酸類生合成経路中の主要酵素であるニコチアミンアミノ基転移酵素 (NAAT) のオオムギゲノム遺伝子を導入し鉄欠乏耐性イネを作出した。本研究では第一に, さらなる石灰質アルカリ土壌耐性の実用品種を創製することによって, 食糧生産の増加と沙漠の緑化を目指す。同時にそれを可能にするための基礎研究を行う。第二に, 世界に37億人と推定される鉄欠乏貧血症(anemia)を改善する機能性食品としてのコメを創製することに挑戦する。最終的に消費者の懸念を払拭するためにマーカー遺伝子を除去した, 安心感のある形質転換作物品種としてのイネ, トウモロコシ, ダイズを創製する。

2. 研究実施内容

イネ科植物は, 根でムギネ酸類を合成し根圏に概日リズムを持って分泌し, 土壌中の不溶態の3価の鉄をキレート化して根の細胞膜に存在する「鉄・ムギネ酸」トランスポーター (YS1) を通して吸収する。イネ科の栽培作物のうちでオオムギはムギネ酸類分泌能が最も高く, トウモロコシ, イネは最も低い。したがって, イネやトウモロコシは高pHの石灰質アルカリ土壌ではほとんど生育できない。我々はすでにムギネ酸類生合成経路中の主要酵素であるニコチアミンアミノ基転移酵素 (NAAT) のオオムギゲノム遺伝子を導入し鉄欠乏耐性イネを作出した。このNAATイネは石灰質アルカリ土壌でのポット試験の結果, ベクターのみを導入したイネの4倍以上の収量を示した。しかしムギネ酸類分泌量においてNAATイネはまだオオムギ並みの能力を有してはいないことが示され, 今後ムギネ酸分泌能力の一層の強化によってさらに鉄欠乏耐性の高いイネの作出が可能であることが証明された。またイネ科以外の作物を鉄欠乏耐性にするために高pHでも酵素活性の強い3価鉄還元酵素の遺伝子 (*refre1:1*) を進化工学的に完全合成している。これにより, イネ科以外

の作物に鉄欠乏耐性を付与することが可能である。

基礎研究として以下の3項目に目標を定めて研究を推進する。

- ①オオムギの鉄欠乏に応答する制御系の解明：鉄欠乏で発現が誘導される遺伝子のプロモーター領域に存在するはずの鉄欠乏応答性シスエレメントと、このシスエレメントと相互作用をするトランス因子を同定し、それをコードする遺伝子を単離する。
- ②鉄の吸収、移行と転流の分子機構の解明：ムギネ酸生合成の中間体ニコチアナミンは、イネ科以外の植物では体内の金属イオンの輸送に関与していると考えられており、鉄は「鉄・ニコチアナミン」として転流することが示唆されている。イネ科植物では「鉄・ニコチアナミン」に加えて、「鉄・ムギネ酸」も体内の鉄の輸送形態のひとつであると想定される。そこで、各組織に存在が予想される「鉄・ニコチアナミン」トランスポーターと「鉄・ムギネ酸」トランスポーターの遺伝子を単離する。また、特に種子特異的なトランスポーターの同定を目指す。これにより種子への鉄集積の制御が可能になり、後述の超高鉄含有米の開発に貢献する。
- ③ムギネ酸類分泌の分子機構の解明：オオムギが概日リズムを持ってムギネ酸類を分泌する機構を遺伝子レベルで解明する。とりわけ未同定のまま残されているムギネ酸類分泌トランスポーター遺伝子をクローニングすることを目指す。さらにムギネ酸類分泌の概日リズムを制御する候補遺伝子を得る。

上記の基礎研究と並行して以下の3項目の実用化研究を行う。

- ④鉄欠乏耐性作物の創製：これまで我々が明らかにしてきたオオムギのムギネ酸類生合成に関わる遺伝子を複数組合わせてイネに導入することにより、さらに強い石灰質アルカリ土壌耐性を示す形質転換イネを選抜する。イネ科以外の作物、タバコ、ダイズを鉄欠乏耐性にする。樹木への導入も視野に入れる。
- ⑤超高鉄含有米の創製：高フェリチン米に、鉄欠乏耐性作物の創製で用いた複合遺伝子を導入して根からの鉄の吸収力を増加させ、さらに鉄の吸収、移行と転流の分子機構の解明により得られた、鉄の移行に関与するトランスポーター能力を増強することによって、結果的に種子への集積を促進させた超高鉄含有米の創製に挑戦する。
- ⑥イネ形質転換用マーカーフリーベクターの開発：消費者の懸念を払拭するためにマーカー遺伝子を除去した安心感のある形質転換作物品種としてのイネ、トウモロコシの創製を目指し、既存のベクターを改変して新規のイネ形質転換用マーカーフリーベクターを開発する。これはイネ科以外の作物にも用いることが可能である。

以上のすべての研究と並行し、得られた形質転換作物の生育試験を隔離圃場において行い、石灰質アルカリ土壌における鉄欠乏耐性のフィールド検定を行う。

3. 研究実施体制

東京大学グループ

- ① 研究分担グループ長：西澤 直子（東京大学大学院農学生命科学研究科、教授）
- ② 研究項目：オオムギの鉄欠乏に応答する制御系の解明

鉄の吸収、移行と転流の分子機構の解明

鉄欠乏耐性作物の創製

電力中央研究所グループ

① 研究分担グループ長：吉原 利一（電力中央研究所、主任研究員）

② 研究項目：オオムギの鉄欠乏に応答する制御系の解明

超高鉄含有米の創製

東京農業大学グループ

① 研究分担グループ長：樋口 恭子（東京農業大学生物応用科学科、講師）

② 研究項目：鉄欠乏耐性作物の創製と耐性検定

ロックフェラー大学グループ

① 研究分担グループ長：Nam-Hai Chua（ロックフェラー大学植物分子生物学、教授）

② 研究項目：イネ形質転換用マーカーフリーベクターの開発

東北大学グループ

① 研究分担グループ長：三枝 正彦（東北大学農学部、教授）

② 研究項目：鉄欠乏耐性イネのフィールド検定

農業生物資源研究所グループ

① 研究分担グループ長：高岩 文雄（農業生物資源研究所、チーム長）

② 研究項目：超高鉄含有米の創製

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Bughio N., Yamaguchi H., Nishizawa N-K., Nakanishi H., Mori S.
Cloning an iron regulated metal transporter from rice. *Journal of Experimental Botany* 53(374): 1677-1682 (2002)
- Nakanishi H., Kiyomiya S., Tsukamoto T., Tsukada H., Uchida H., Mori S.
Water ($H_2^{15}O$) flow in rice is regulated by the concentration of nutrients as monitored by Positron Multi-Probe System (PMPS). *Soil Science and Plant Nutrition* 48:759-762 (2002)
- Negishi T., Nakanishi H., Yazaki J., Kishimoto N., Fujii F., Shimbo K., Yamamoto K., Sakata K., Sasaki T., Kikuchi S., Mori S., Nishizawa N. K.
cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant Journal* 30: 83-94 (2002)
- Nagasaka S., Nishizawa N. K., Negishi T., Satake K., Mori S., Yoshimura E.
Novel iron-storage particles may play a role in aluminum tolerance of *Cyanidium caldarium*.

Planta 215: 399-404 (2002)

- Teraoka T., Kaneko M., Mori S., Yoshimura E.
Aluminium rapidly inhibits cellulose synthesis in roots of barley and wheat seedlings.
Journal of Plant Physiology 159(1): 17-23 (2002)
- Yamaguchi H., Nishizawa N. K., Nakanishi H., Mori S.
IDI7, a new iron-regulated ABC transporter from barley roots, localizes to the tonoplast.
Journal of Experimental Botany 53: 727-735 (2002)
- Bughio N., Nakanishi H., Kiyomiya S., Matsushashi S., Ishioka N. S., Watanabe S., Uchida H., Tsuji A., Osa A., Kume T., Hashimoto S., Sekine T., Mori S.
Real-time [¹¹C]methionine translocation in barley in relation to mugineic acid phytosiderophore biosynthesis. Planta 213(5): 708-715 (2001)
- Higuchi K., Takahashi M., Nakanishi H., Kawasaki S., Nishizawa N. K., Mori S.
Analysis of transgenic rice containing barley nicotianamine synthase gene. Soil Science and Plant Nutrition 47: 315-322 (2001)
- Higuchi K., Tani M., Nakanishi H., Yoshiwara T., Goto F., Nishizawa N. K., Mori S.
The expression of a barley *HvNAS1* nicotianamine synthase gene promoter-*gus* fusion gene in transgenic tobacco is induced by Fe-deficiency in roots. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65(7): 1692-1696 (2001)
- Higuchi K., Watanabe S., Takahashi M., Kawasaki S., Nakanishi H., Nishizawa N. K., Mori S.
Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe-deficient conditions.
Plant Journal 25: 159-168 (2001)
- Kiyomiya S., Nakanishi H., Uchida H., Tsuji A., Nishiyama S., Futatsubashi M., Tsukada H., Ishioka N. S., Watanabe S., Osa A., Matsushashi S., Hashimoto S., Sekine T., Mori S.
Real time visualization of ¹³N translocation in rice under different environmental conditions using positron emitting tracer imaging system. Plant Physiology 125: 1743-1753 (2001)
- Kiyomiya S., Nakanishi H., Tsuji A., Uchida H., Nishiyama S., Tsukada H., Ishioka N. S., Watabnab S., Osa A., Mizuniwa C., Matsushashi S., Hashimoto S., Sekine T., Mori S.
Light activates H₂¹⁵O flow in rice - Detailed monitoring using a positron-emitting tracer imaging system (PETIS). Physiologia Plantarum 113(3):

359-367 (2001)

- Kobayashi T., Nakanishi H., Takahashi M., Kawasaki S., Nishizawa N. K., Mori S.

In-vivo evidence that *Ids3* from *Hordeum vulgare* encodes a dioxygenase that converts 2'-deoxymugineic acid to mugineic acid in transgenic rice. *Planta* 212: 864-871 (2001)

- Suzuki K, Nakanishi H, Nishizawa NK, Mori S

Analysis of upstream region of nicotianamine synthase gene from *Arabidopsis thaliana*: Presence of putative ERE-like sequence. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2794-2797 (2001)

- Takahashi M., Nakanishi H., Kawasaki S., Nishizawa N. K., Mori S.

Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotechnology* 19: 466-469 (2001)

- Yoshihara T., Goto F., Masuda T.

Utilization of the apoplasmic space in tobacco for accumulation of cadmium. CRIEPI report, U02001, PP1-23.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：3件（研究期間累積件数：3件）